



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 195 25 784 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 K 16/00**  
C 07 K 7/08  
C 07 K 7/06  
A 61 K 38/08  
A 61 K 38/10

②1 Aktenzeichen: 195 25 784.7  
②2 Anmeldetag: 14. 7. 95  
④3 Offenlegungstag: 16. 1. 97

DE 195 25 784 A 1

⑦1 Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE  
  
⑦4 Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦2 Erfinder:  
Endl, Josef, Dr., 82362 Weilheim, DE; Stahl, Peter,  
Dr., 82347 Bernried, DE; Albert, Winfried, Dr., 82390  
Eberfing, DE; Schendel, Dolores, Prof. Dr., 80469  
München, DE; Boitard, Christian, Prof. Dr., Paris, FR;  
Ender, Peter van, Dr., Paris, FR; Jung,  
Günther-Gerhard, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE

- ⑤4 Autoreaktive Peptide aus der humanen Glutamin-Decarboxylase (GAD)  
⑤7 Die Erfindung betrifft autoreaktive Peptide, Peptid-MHC-Komplexe, damit reagierende T-Zellsubpopulationen sowie diagnostische und therapeutische Anwendungen dieser Verbindungen.

DE 195 25 784 A 1

BEST AVAILABLE COPY

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Autoimmunreaktion hervorrufende Peptide, Komplexe dieser Peptide mit Molekülen des Major Histocompatibility Komplex (MHC) mit den Peptiden oder/und den Komplexen aus Peptiden und MHC-Molekülen reagierende T-Zellsubpopulationen sowie diagnostische und therapeutische Anwendungen dieser Verbindungen.

Die Aufklärung der molekularen Zusammenhänge bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie etwa der rheumatoiden Arthritis und des juvenilen Diabetes (IDDM), ist innerhalb der letzten Jahre schnell fortgeschritten und läßt mittlerweile konkrete Anwendungen für die frühe Diagnose und eine kausale Therapie dieser Erkrankungen erkennen.

Heute gilt als gesichert, daß bei der Entstehung dieser Erkrankungen neben einer genetischen Disposition auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Auf der Ebene der genetischen Risikofaktoren sind z. B. bei dem IDDM nur einige wenige Allele der MHC-Klasse II-Antigene eng mit dieser Erkrankung assoziiert. Somit besteht die Möglichkeit, über eine Analyse dieser Allele eine Risikogruppe für IDDM zu definieren (vgl. z. B. Thomson et al., *Am. J. Hum. Genet.* 43 (1988), 799—816 oder Todd et al., *Nature* 329 (1987), 599—604).

Bei den an der Entstehung von IDDM beteiligten Umweltfaktoren handelt es sich wahrscheinlich um exogene, als Immunogen wirksame Peptidsequenzen. In diesem Zusammenhang werden u. a. virale Antigene, die partielle Homologien zu körpereigenen Strukturen aufweisen, diskutiert. Unter besonderen Umständen, insbesondere in der postnatalen Phase, können durch die Nahrung aufgenommene Antigene, wie z. B. Rinderserumalbumin, eine Immunantwort induzieren, welche aufgrund von Homologien zu körpereigenen Strukturen einen autoaggressiven Prozeß in Gang setzen können.

Typisch für den Krankheitsverlauf bei IDDM ist die progressive Zerstörung der Pankreas- $\beta$ -Zellen durch cytotoxische Lymphozyten. Dieser Prozeß setzt schon lange vor einer erkennbaren Störung des Glucosestoffwechsels ein. Bei einer erkennbaren Manifestation des Diabetes sind bereits über 90% der  $\beta$ -Zellen zerstört. Es wäre deshalb außerordentlich wichtig, diese autoaggressiven T-Zellen frühzeitig bei Risikopersonen zu erfassen, um die betroffenen Individuen einer kausalen Therapie zuführen zu können.

Es gilt heute als gesichert, daß die Zerstörung von körpereigenem Gewebe bei Autoimmunerkrankungen anfänglich sehr langsam verläuft. Im Anfangsstadium dieses Prozesses erkennen die autoaggressiven T-Zellen wahrscheinlich nur ein oder wenige Autoantigene. Arbeiten von Kaufman et al. (*Nature* 368 (1993), 69—72) und Tisch et al. (*Nature* 368 (1993), 72—78) an einem Tiermodell (NOD-Maus) des Typ I-Diabetes haben ergeben, daß beim spontan auftretenden Diabetes dieses Mausstammes die Initiale, über T-Zellen vermittelte Auto-Immunreaktion gegen die Glutaminsäure-Decarboxylase gerichtet ist. Dabei werden in der NOD-Maus anfänglich nur 1 bis 2 Epitope am C-Terminus der Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) erkannt. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich — wie oben ausgeführt — noch keine Veränderungen im Glucose-Metabolismus feststellen, während hingegen eine Perinsulinitis bereits nachweisbar ist. Erst im weiteren Krankheitsverlauf weitet sich das Spektrum der von den autoaggressiven T-Zellen erkannten Peptide der GAD aus. Nach einer Manifestation des Diabetes sind auch präaktivierte T-Zellen gegen andere Inselzell-Antigene nachweisbar, z. B. Peripherin, Heat Shock Protein HSP 65 und Carboxypeptidase H.

Es gibt Hinweise, daß auch beim Menschen die Immunantwort gegen GAD ursächlich mit dem Entstehen des Typ I-Diabetes verknüpft ist. So lassen sich beispielsweise in über 80% der Prädiabetiker Autoantikörper gegen GAD nachweisen, wobei die ätiologische Rolle dieser Autoantikörper allerdings gering eingeschätzt wird. Man nimmt vielmehr an, daß beim Typ I-Diabetes eine progressive Zerstörung der Pankreas- $\beta$ -Zellen durch T-Lymphozyten vorliegt. Diese gegen GAD gerichteten T-Lymphozyten konnten bereits von mehreren Forschergruppen nachgewiesen werden (Harrison et al., *J. Clin. Invest.* 89 (1992), 1161; Honeyman et al., *J. Exp. Med.* 177 (1993) 535). Die von diesen Gruppen gefundenen Autoantikörper reagierten mit einem aus den Aminosäuren 208 bis 404 bestehenden Peptidfragment des GAD 67 kd Moleküls.

In EP-A 0 519 469 werden autoimmun reagierende Polypeptide aus dem humanen GAD 65 kd Molekül offenbart. Diese Polypeptide haben die Aminosäuresequenz:

X-P-E-V-K- (T oder E) -K-Z,

wobei X eine fakultative, aus 1 bis 10 Aminosäuren ausgewählte Sequenz ist und Z eine fakultative, aus 1 bis 8 Aminosäuren ausgewählte Sequenz ist.

In der europäischen Patentanmeldung Nr. 95 100 764.0 werden autoreaktive Peptidsequenzen aus der humanen GAD 65 kd vorgeschlagen, umfassend:

(a) die Aminosäuresequenz

G-M-A-A-L-P-R-L-I-A-F-T-S-E-H-S-H-F-S-L-K-K-G-A-A,

(b) die Aminosäuresequenz

E-R-G-K-M-I-P-S-D-L-E-R-R-I-L-E-A-K-Q-K,

(c) eine der in Abb. 1 oder 2 dargestellten Aminosäuresequenzen,

(d) Teilbereiche der in (a), (b) oder/und (c) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und

(e) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung

an MHC-Moleküle wie die in (a), (b), (c) oder/und (d) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, neue autoreaktive Peptide bereit zustellen, die mit T-Zellen aus Typ I-Diabetikern, insbesondere mit T-Zellen aus frisch entdeckten Typ I-Diabetikern reagieren und somit frühe Auto-Epitope definieren.

Diese Aufgabe wird gelöst durch Peptide, Peptid-Derivate oder analog bindende Moleküle, die zum Nachweis, zur Isolierung, zur Vermehrung, zur Anergisierung oder/und zur Elimination autoreaktiver T-Zellen geeignet sind. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Peptid oder Peptid-Derivat, umfassend:

(a) die Aminosäuresequenz (I)

D-V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A-C-D-G-E-R,

(b) die Aminosäuresequenz (II)

S-N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P-E-V-K-E-K,

(c) die Aminosäuresequenz (III)

N-W-E-L-A-D-Q-P-Q-N-L-E-E-I-L-M-H-C-Q-T,

(d) die Aminosäuresequenz (IV)

T-L-K-Y-A-I-K-T-G-H-P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G,

(e) die Aminosäuresequenz (V)

P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G-L-A-A-D-W,

(f) die Aminosäuresequenz (VI)

T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R,

(g) Teilbereiche der in (a), (b), (c), (d), (e) oder/und

(f) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und

(h) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die in (a), (b), (c), (d), (e), (f) oder/und (g) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.

Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) entsprechen den Aminosäureresten 86—105 (I), 246—265 (II), 146—165 (III), 166—185 (IV), 176—195 (V) und 206—225 (VI) der humanen GAD 65.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß Peptide, welche den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) der humanen GAD 65 entsprechen, eine spezifische Reaktion mit T-Zellsubpopulationen zeigten, die aus frisch entdeckten Typ I-Diabetikern isoliert wurden. Somit handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Peptiden um frühe Autoepitope, mit deren Verwendung eine sehr frühe Diagnose des Typ I-Diabetes ermöglicht wird. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Peptide auch therapeutisch angewendet werden, indem die mit den Peptiden reaktive T-Zellpopulation ausgeschaltet wird.

Bevorzugte Beispiele für T-Zellsubpopulationen, mit denen die erfindungsgemäßen Peptide der Aminosäuresequenzen (I) oder/und (II) reagieren, sind die T-Zelllinien R.B. und M.C. oder T-Zellen mit einer äquivalenten Bindungsspezifität.

Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) sind Teilbereiche aus der 65 kD Isoform der humanen Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD), deren vollständige Aminosäuresequenz von Bu et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 2115 ff.) beschrieben wurde. Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) wurden durch Anlegen von T-Zelllinien aus dem peripheren Blut von Typ I-Diabetikern und anschließende in vitro Stimulation mit rekombinanter humaner GAD und Testen dieser T-Zelllinien in einem Proliferationsassay mit synthetischen Peptidsequenzen gefunden, die aus der humanen GAD-Sequenz abgeleitet wurden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können durch bekannte Syntheseverfahren mittels chemischer Methoden erzeugt werden oder durch Klonierung und Expression einer für diese Peptide codierenden DNA-Sequenz in einer geeigneten Wirtszelle, insbesondere E.coli, auf gentechnische Weise hergestellt werden.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch Peptide mit Teilbereichen der spezifisch angegebenen Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V) oder (VI), die eine Länge von mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens 8 Aminosäuren, besonders bevorzugt von mindestens 10 Aminosäuren und am meisten bevorzugt von mindestens 15 Aminosäuren aufweisen. Die minimale Länge eines erfindungsgemäßen Peptids wird durch seine Fähigkeit bestimmt, ein MHC-Molekül zu erkennen, mit ihm spezifisch zu binden und mit dem entsprechenden T-Zellrezeptor zu reagieren.

Die maximale Länge der aus der GAD stammenden und MHC-bindenden Abschnitte in einem erfindungsgemäßen Peptid beträgt vorzugsweise 100 Aminosäuren, besonders bevorzugt 50 Aminosäuren und am meisten bevorzugt 25 Aminosäuren.

Neben Peptiden mit den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) oder Teilbereichen davon betrifft die Erfindung

auch noch Peptide mit Aminosäuresequenzen, die im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Sequenzen zeigen und die vorzugsweise durch Substitution, Deletion oder Insertion einzelner Aminosäurereste oder kurzer Abschnitte von Aminosäureresten aus den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) abgeleitet sind oder analog bindende verfremdete Substanzen.

5 Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung auch Peptidvarianten, die in ihrer Sequenz mit den oben genannten Aminosäuresequenzen nicht völlig übereinstimmen, sondern nur gleiche oder nahe verwandte "Ankerpositionen" aufweisen. Die Bezeichnung "Ankerposition" bedeutet in diesem Zusammenhang einen für die Bindung an ein MHC-Molekül, insbesondere an ein MHC-Molekül der Klassen DR1, DR2, DR3, DR4 oder DQ, wesentlichen Aminosäurerest. Die Ankerposition für das DRB1 0401-Bindungsmotiv sind z. B. bei Hammer et al.,  
10 Cell 74 (1993), 197–203, angegeben. Derartige Ankerpositionen sind in erfindungsgemäßen Peptiden konserviert oder gegebenenfalls durch Aminosäurereste mit chemisch sehr nahe verwandten Seitenketten ersetzt (z. B. Alanin durch Valin, Leucin durch Isoleucin und umgekehrt). Die Bestimmung der Ankerpositionen in den erfindungsgemäßen Peptiden kann auf einfache Weise durch Tests von Varianten der oben angegebenen spezifischen Peptide auf ihre Bindungsfähigkeit an MHC-Moleküle erfolgen. Erfindungsgemäße Peptide sind  
15 dadurch gekennzeichnet, daß sie eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Peptide zeigen. Vorzugsweise besitzen die aus Peptiden mit den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) abgeleiteten Peptide eine Sequenzhomologie von mindestens 30%, besonders bevorzugt von mindestens 50% und am meisten bevorzugt mindestens 60% mit den Ausgangspeptiden oder Teilsequenzen davon.

20 Beispiele für Varianten der spezifisch angegebenen Peptide sind die entsprechenden homologen Peptidabschnitte aus der humanen GAD 67, deren vollständige Aminosäuresequenz ebenfalls von Bu et al., supra, beschrieben wurde.

Der Begriff "im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle" umfaßt auch eine gegenüber den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) verbesserte Bindungsspezifität oder/und  
25 -affinität, die insbesondere bei verkürzten Peptiden gefunden wird, die eine Länge von vorzugsweise 8 bis 15 Aminosäuren besitzen.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch Peptid-Derivate. Dieser Begriff umfaßt Peptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch eine chemische Reaktion derivatisiert worden sind. Beispiele von erfindungsgemäßen Peptid-Derivaten sind insbesondere solche Moleküle, in denen das Backbone oder/und reaktive  
30 Aminosäureseitengruppen, z. B. freie Aminogruppen, freie Carboxylgruppen oder/und freie Hydroxylgruppen, derivatisiert worden sind. Spezifische Beispiele für Derivate von Aminogruppen sind Sulfonsäure- oder Carbonsäureamide, Thiourethanderivate und Ammoniumsalze, z. B. Hydrochloride. Beispiele für Carboxylgruppenderivate sind Salze, Ester und Amide. Beispiele für Hydroxylgruppenderivate sind O-Acyl- oder O-Alkylderivate. Weiterhin umfaßt der Begriff Peptid-Derivat gemäß vorliegender Erfindung auch solche Peptide, in denen eine  
35 oder mehrere Aminosäuren durch natürlich vorkommende oder nicht natürlich vorkommende Aminosäurehomologe der 20 "Standard"-Aminosäuren ersetzt werden. Beispiele für solche Homologe sind 4-Hydroxyprolin, 5-Hydroxylysin, 3-Methylhistidin, Homoserin, Ornithin,  $\beta$ -Alanin und 4-Aminobuttersäure.

Insbesondere sind solche Peptide bevorzugt, welche eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie Peptide mit den Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) aufweisen, die  
40 aber im Gegensatz zu diesen Peptiden keine Aktivierung von T-Zellen, sondern die Erzeugung eines anergen Zustands in T-Zellen hervorrufen.

Von der vorliegenden Erfindung werden auch Polypeptide erfaßt, in denen der MHC-bindende Peptidabschnitt Bestandteil einer größeren Polypeptideinheit ist, wobei die Verbindung von MHC-bindendem Peptid und dem Rest der Polypeptideinheit vorzugsweise eine Sollbruchstelle aufweist, z. B. eine Proteasespaltstelle.

45 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Peptid oder Peptid-Derivat, das eine signalerzeugende Substanz bzw. eine Markierungsgruppe, z. B. eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe (z. B. Rhodamin, Phycoerythrin), Digoxin, Biotin, eine radioaktive Gruppe oder eine Toxingruppe (z. B. Ricin, Choleratoxin etc.) trägt. Durch Kopplung des erfindungsgemäßen Peptids mit Markierungsgruppen kann das Peptid als diagnostisches Mittel für in vivo oder in vitro (z. B. Imaging) Anwendungen oder als therapeutisches Mittel eingesetzt werden.  
50 Weiterhin kann das erfindungsgemäße Peptid auch beispielsweise in cyclisierter Form oder in oligomerer Form vorliegen, wobei die für die Bindung an das MHC-Molekül wichtigen Sequenzen durch Spacerregionen voneinander getrennt sind.

Die Erfindung betrifft auch peptidmimetische Substanzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Peptide oder Peptid-Derivate  
55 zeigen. Peptidmimetische Substanzen oder Peptidmimetika sind Verbindungen, die Peptide in ihrer Wechselwirkung mit den MHC-Molekülen ersetzen können und gegenüber den nativen Peptiden eine erhöhte metabolische Stabilität, bessere Bioverfügbarkeit und größere Wirkungsdauer aufweisen können. Methoden zur Herstellung von Peptidmimetika sind beschrieben bei Giannis und Kolter, Angew. Chem. 105 (1993), 1303–1326, Lee et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 66 (1993), 2006–2010 und Dorsch et al., Kontakte (Darmstadt) (1993) (2), 48–56. Bezüglich  
60 der Herstellung erfindungsgemäßer peptidmimetischer Substanzen wird auf die Offenbarung dieser Literaturstellen verwiesen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Komplex, der mindestens ein erfindungsgemäßes Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum und mindestens ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes  
65 Derivat eines MHC-Moleküls umfaßt. In diesem Komplex ist ein Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum mit einer Bindungskonstante von vorzugsweise mindestens  $10^{-7}$  l/mol, besonders bevorzugt im Bereich von  $10^{-8}$ – $10^{-9}$  l/mol, an ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls gebunden. Alternativ kann das Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum auch kovalent an das MHC-Molekül gekoppelt sein, z. B. über einen Photolinker oder als kovalente genetische Peptid-MHC-Fusion. Ein derartiges Peptid-

MHC-Fusionsprotein enthält vorzugsweise eine HLA-DR beta-Kette und ein damit genetisch fusioniertes autoreaktives Peptid. Besonders bevorzugt enthält der Komplex ein MHC-Klasse II-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon.

Das MHC-Klasse II-Molekül ist vorzugsweise vom Typ DR, beispielsweise vom Typ DR1, DR2 oder DQ6. Besonders bevorzugt ist das MHC-Klasse II-Molekül vom Subtyp DR B1 0101, DR B1 1501, DR B1 1502 oder DQ B1 0602. Die T-Zelllinie R.B. proliferiert mit dem autoreaktiven Peptid der Aminosäuresequenz 86–105 von GAD 65 kd in Anwesenheit des DR B1-Allels 0101. Die T-Zelllinie M.C. proliferiert mit dem autoreaktiven Peptid der Aminosäuresequenz 246–265 von rGAD in Gegenwart des DR B1-Allels 1501 oder/und des DQ B1-Allels 0602.

Die Nukleotidsequenzen der für ein MHC-Klasse II-Molekül der obigen Subtypen kodierenden Gene sind veröffentlicht in Corell et al. (Mol. Immunol. 28 (1991), 533–543). Auf den Inhalt dieser Publikation wird hiermit Bezug genommen.

Der Begriff "peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls" umfaßt Fragmente von MHC-Molekülen, die durch proteolytische Spaltung nativer MHC-Moleküle oder durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt sind und ihre peptidbindenden Eigenschaften im wesentlichen beibehalten haben. Weiterhin sind unter diesem Begriff Fusionsproteine zu verstehen, die neben einem für die Peptidbindung verantwortlichen MHC-Anteil noch weitere Polypeptid-Komponenten enthalten.

Die erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplexe werden vorzugsweise durch Assoziierung peptidfreier MHC-Moleküle oder MHC-Molekülderivate mit den erfindungsgemäßen Peptiden, Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika hergestellt. Die Herstellung von peptidfreien MHC-Molekülen kann beispielsweise durch Entfaltung von nativen MHC-Molekülen, um gebundene Peptide zu dissoziieren, und Rückfaltung der leeren MHC-Moleküle erfolgen (siehe Dormair und McConnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 4134–4138 und WO91/14701).

Andererseits können peptidfreie MHC-Moleküle auch durch rekombinante Herstellung von MHC-Molekülen oder Derivaten davon gewonnen werden. Beispiele hierfür sind die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen in Fibroblasten (Germain und Malissen, Ann. Rev. Immunol. 4 (1990), 281–315) sowie die Expression von löslichen MHC-Klasse II-Molekülderivaten ohne Membrananker in CHO-Zellen (Wettstein et al., J. Exp. Med. 174 (1991), 219–228; Buelow et al., Eur. J. Immunol. 23 (1990), 69–76) und mittels des Baculovirus-Expressionssystems in Insektenzellen (Stern und Wiley, Cell 68 (1992), 465–477; Scheirle et al., J. Immunol. 149 (1992), 1994–1999). Auch MHC-Klasse I-Moleküle wurden in CHO-Zellen (Fahnestock et al., Science 258 (1992), 1658–1662) in Insektenzellen (Jackson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 12117–12120; Matsamura et al., J. Biol. Chem. 267 (1992), 23589–23595) sowie in Fibroblasten (Mage et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 10658–10661) exprimiert.

Weiterhin ist auch die Expression von peptidfreien MHC-Molekülen in E.coli bekannt (Parker et al., Mol. Immunol. 29 (1992), 371–378; Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 8403–8407; Garboczi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 3429–3433; Altman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 10330–10334). Auf die in diesen Veröffentlichungen beschriebenen Techniken zur rekombinanten Expression von MHC-Molekülen oder MHC-Molekülderivaten wird für die vorliegende Erfindung Bezug genommen.

Vorzugsweise ist der MHC-Bestandteil des erfindungsgemäßen Komplexes ein rekombinantes MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon und besonders bevorzugt ein lösliches MHC-Molekülderivat, bei dem der Membrananker teilweise oder vollständig deletiert ist.

Zur Identifizierung von MHC-Molekülen, welche das erfindungsgemäße autoreaktive Peptid präsentieren, werden die Antigen präsentierenden Zellen eines Spenders mit dem erfindungsgemäßen Peptid in markierter Form inkubiert, wobei vorzugsweise zuerst gebundene Peptide durch Denaturierung nativer MHC-Moleküle dissoziiert werden. Anschließend können die markierten MHC-Peptid-Komplexe mit Subtyp-spezifischen Antikörpern, die gegen Framework-spezifische Determinanten der MHC-Moleküle gerichtet sind, immunpräzipitiert und aufgrund des Vorhandenseins der markierten Peptide identifiziert werden.

Alternativ können als Antigen präsentierende Zellen auch EBV (Epstein-Barr-Virus) transformierte B-Zellen des Spenders verwendet werden.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Komplexe aus einem rekombinanten MHC-Molekülderivat kann beispielsweise so erfolgen, daß DNA-Fragmente für die löslichen Teile der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten eines MHC-Moleküls, z. B. eines MHC-DR1-, DR2- oder DQ1-Moleküls durch PCR isoliert werden, wobei als Template cDNA aus einer EBV transformierten B-Zelllinie des Spenders benutzt wird, welche das entsprechende MHC-Molekül exprimiert. Bei diesem Schritt wird vorzugsweise am C-Terminus der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette durch entsprechende Auswahl des PCR-Primers eine Reinigungshilfe, z. B. ein Oligohistidinsegment (z. B. ein Hexa-Histidin-Segment), eingeführt. Die PCR-Produkte können anschließend in E.coli subkloniert und als Inclusion-Bodies exprimiert werden. Die Inclusion-Bodies können nach bekannten Verfahren (vgl. Literaturstellen zur Expression von MHC-Molekülen in E.coli, supra) solubilisiert und die MHC-Proteine mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Anschließend werden die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten in Anwesenheit des Peptids renaturiert.

Der erfindungsgemäße Peptid-MHC-Komplex kann auch eine wie oben beschriebene Markierungsgruppe tragen, wobei die Markierungsgruppe sowohl am Peptidbestandteil als auch am MHC-Bestandteil des Komplexes durch bekannte Methoden gebunden sein kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein oligomerisierter Peptid-MHC-Komplex, der mindestens 2 MHC-Moleküle oder MHC-Molekülderivate enthält, die über kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkungen assoziiert sind. Ein derartiger oligomerisierter Peptid-MHC-Molekül-Komplex hat gegenüber bekannten (bezüglich des MHC-Moleküls) monomeren Komplexen den Vorteil einer höheren Affinität und somit einer verbesserten diagnostischen oder/und therapeutischen Wirksamkeit.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann ein derartiger oligomerisierter Komplex durch kovalente Quervernetzung von monomeren Peptid/MHC-Molekül-Komplexen über chemische Kopplungsreagenzien, z. B. N-Succinimidyl-3(2-pyridylthio)propionat, 3-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester, Maleimidohexanoyl-N-hydroxy-succinimidester, Bis(maleimidomethyl)ether, Disuccinimidylsuberat, Glutardialdehyd etc. nach bekannten Verfahren hergestellt werden. Gegebenenfalls können auch einzelne Aminosäuren der Peptidkomponente oder der MHC-Komponente so verändert sein, daß spezielle Kopplungsreagenzien an dieser Stelle bevorzugt angreifen. So lassen sich durch Einführung von zusätzlichen Cystein- oder Lysin-Resten auf rekombinantem Wege bei der Proteinkomponente bzw. durch chemische Synthese bei der Peptidkomponente Kopplungen über SH-Linker bzw. über Aminogruppen erzielen.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann der oligomerisierte Peptid-MHC-Komplex so hergestellt werden, daß die an das MHC-Molekül bindende Peptidkomponente als Oligomer eingesetzt wird, d. h. als ein Peptidmolekül, das mindestens 2 MHC-bindende Bereiche enthält, wobei die für die Bindung an das MHC-Molekül wichtigen Sequenzen durch Spacerregionen voneinander getrennt sind. Diese Spacerregionen bestehen üblicherweise aus 10–15 Aminosäuren. Man verwendet kleine, hydrophile Aminosäuren, z. B. Glycin, Alanin, Serin, Prolin bzw. Kombinationen davon. Bei einer Renaturierung von peptidfreien MHC-Molekülen in Anwesenheit dieser Peptidoligomere entsteht der erfindungsgemäße oligomerisierte Komplex, der durch die oligomerisierte Peptidkomponente über nicht-kovalente Wechselwirkungen vernetzte MHC-Moleküle enthält.

Weiterhin können oligomerisierte Peptid-MHC-Komplexe durch Modifikation rekombinant hergestellter MHC-Moleküle erzeugt werden. So kann bei Herstellung der Vektoren für die Expression rekombinanter  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Ketten von MHC-Klasse II-Molekülen ein Gensegment, vorzugsweise jeweils am C-Terminus, einkloniert werden, das für ein Epitop codiert, das von einem Antikörper erkannt wird. Dieser Antikörper kann vom IgG-Typ, vorzugsweise aber vom IgM-Typ sein. Die renaturierten monomeren Peptid/MHC-Komplexe werden dann mit einem, das eingeführte Epitop erkennenden Antikörper inkubiert, so daß nicht-kovalent vernetzte Immunkomplexe, bestehend aus mehreren Antikörpern und mehreren Peptid-MHC-Komplexen, erzeugt werden. Die Einführung von DNA-Segmenten, die für ein Epitop codieren, in die für die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Kette des MHC-Moleküls codierenden DNA-Fragmente kann mittels bekannter molekularbiologischer Techniken erfolgen, z. B. durch Insertion in Restriktionsstellen oder durch zielgerichtete Mutagenese.

Der erfindungsgemäße oligomerisierte Peptid-MHC-Komplex enthält ein Peptid, das die Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), Teilbereiche davon oder/und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen umfaßt, oder ein Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum davon. Der oligomerisierte Komplex kann vorzugsweise als diagnostisches oder therapeutisches Reagenz bei Typ I-Diabetes eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft somit auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex als aktive Komponente gegebenenfalls in Kombination mit pharmazeutisch üblichen Zusatzstoffen enthält. Die Zusammensetzung kann weiterhin eine akzessorische stimulierende Komponente enthalten, z. B. Cytokine wie IL-2 und IL-4 oder/und das Oberflächenantigen B7 (Wyss-Coray et al., Eur. J. Immunol. 23 (1993), 2175–2180; Freeman et al., Science 262 (1993), 909–911), das mit dem Oberflächenmolekül CD-28 auf einer T-Zelle binden kann. Die Anwesenheit der akzessorischen stimulierenden Komponente kann die therapeutische Wirkung der Zusammensetzung verbessern oder/und modifizieren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex enthält zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Erkrankungen oder einer Prädisposition für Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen, oder für die Diagnose von Tumorerkrankungen oder einer Prädisposition für Tumorerkrankungen, insbesondere für die Diagnose von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition für Autoimmunerkrankungen, z. B. Diabetes Typ I oder Typ II, vorzugsweise Diabetes Typ I.

Analoge diagnostische Anwendungen sind jedoch auch bei anderen Autoimmunerkrankungen möglich. Beispiele derartiger Autoimmunerkrankungen sind Multiple Sklerose, wo reaktive T-Zellen gegen das Myelin Basic Protein oder das Proteolipid-Protein bestimmt werden können, rheumatoide Arthritis, wo reaktive T-Zellen gegen Kollagen Typ II, Cytokeratine und Hsp 65 bestimmt werden können, Basedow-Krankheit, wo reaktive T-Zellen gegen Thyroidperoxidase bestimmt werden können.

Allgemein ist die diagnostische Anwendung bei allen Erkrankungen möglich, die das Immunsystem beeinflussen, wie z. B. auch bei der Arteriosklerose. Hier wurde eine Assoziation der Krankheit mit einer Immunantwort gegen das Heat Shock Protein Hsp 65 nachgewiesen (Xu et al., Lancet 341, 8840 (1993), 255–259).

Noch eine weitere Anwendung ist der diagnostische Nachweis von T-Zellen, die gegen Tumorantigene reagieren. Beispiele hierfür sind T-Zellen gegen ein Melanom-assoziiertes Antigen MAGE 1, die aus Melanompatienten isoliert wurden (van der Bruggen et al., Science 254 (1991), 1643–1647). Der Nachweis dieser T-Zellen kann mit erfindungsgemäßen oligomerisierten Komplexen schon in einem Stadium erfolgen, in dem der Tumor aufgrund einer noch zu geringen Zellmasse mit herkömmlichen Methoden noch nicht nachweisbar ist. Ferner könnte der Nachweis von spezifisch reagierenden T-Zellen auch zur Verlaufskontrolle bei einer Anti-Tumorvakzinierung eingesetzt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine T-Zellen enthaltende Probe, die vorzugsweise aus einer Körperflüssigkeit, z. B. Vollblut, stammt, mit einem erfindungsgemäßen Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einem erfindungsgemäßen Komplex in Kontakt bringt und die Reaktion von T-Zellen mit dem Peptid oder Komplex bestimmt. Eine spezifische Reaktion von T-Zellen mit dem Komplex oder dem Peptid kann z. B. durch eine erhöhte T-Zellenproliferation nachgewiesen werden, die sich durch den Einbau von Radioaktivität messen läßt. Andererseits kann die Reaktion von T-Zellen auch direkt durch Verwen-

dung eines markierten Peptids oder Komplexes bestimmt werden. Bei dieser Ausführungsform werden das Peptid oder der Komplex vorzugsweise mit einer daran gekoppelten Fluoreszenzmarkierungsgruppe verwendet. Die Auswertung kann beispielsweise durch FACS-Analyse erfolgen, wobei die T-Zellen mit einem ersten Fluoreszenzmarker, der an einen T-Zell-spezifischen Antikörper gekoppelt ist, und dann mit dem Peptid-MHC-Komplex, der mit einem zweiten Fluoreszenzmarker gekoppelt ist, in Kontakt gebracht werden und das Vorhandensein von doppelmarkierten Zellen durch fluorographische Analyse bestimmt wird. Auf diese Weise wird eine T-Zell-Subpopulation bestimmt, die durch ihre Reaktivität mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder Peptid-Derivat oder/und mit einem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex charakterisiert ist. Aufgrund der geringen Konzentration der spezifischen T-Zell-Population im Blut erfolgt als erster Schritt des Verfahrens vorzugsweise eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen, z. B. eine selektive Anreicherung von IL-2-Rezeptor-positiven T-Zellen durch Inkubation mit IL-2 oder/und durch Inkubation mit IL-2-Rezeptor-Antikörper und anschließende Separation der Antikörper-bindenden Zellen beispielsweise mit immunmagnetischen Methoden. Andererseits kann die Selektion auf präaktivierte Zellen erst nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex erfolgen.

In einer Abwandlung dieses Verfahrens kann auch das Verhältnis von präaktivierten autoreaktiven T-Zellen, d. h. T-Zellen mit dem IL-2-Rezeptor als Oberflächenmarker, zu nicht-aktivierten autoreaktiven T-Zellen, d. h. T-Zellen ohne den IL-2-Rezeptor, bestimmt werden.

Dieses Verfahren kann insbesondere zur Diagnose von Typ I-Diabetes, aber auch bei anderen das Immunsystem beeinflussenden Erkrankungen bzw. zur Diagnose einer Prädisposition für derartige Erkrankungen angewendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ein Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex enthält, zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen. Zur therapeutischen Anwendung der erfindungsgemäßen Peptide und der erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplexe können beispielsweise mit Toxinen gekoppelte Peptide oder Peptid-MHC-Komplexe verwendet werden, andererseits können aber auch Peptide alleine oder als Bestandteile des Komplexes eingesetzt werden, die zwar eine Bindung an den T-Zellrezeptor ermöglichen, aber keine Aktivierung der T-Zelle hervorrufen, d. h. die also anergisierend wirken.

Die therapeutische Wirkung derartiger anergisierender Peptidanaloga beruht darauf, daß der T-Zellrezeptor (TCR) zur Aktivierung der T-Zelle mit einem Peptid wechselwirken muß, das von einem MHC-Antigen der Klasse I oder Klasse II präsentiert wird. Dabei sind insbesondere Aminosäuren in Ankerpositionen des Peptids für die Bindung an das MHC-Molekül verantwortlich, während andere Aminosäuren im Peptid zur Wechselwirkung mit dem TCR beitragen und somit eine T-Zellstimulation hervorrufen. Durch Aminosäuresubstitutionen in den Peptiden können nun Peptidanaloga hergestellt werden, die aufgrund des Vorhandenseins der Ankerpositionen noch an das MHC-Molekül binden, andererseits aber nur eine partielle oder keine T-Zellaktivierung hervorrufen (vgl. z. B. Sloan-Lancaster et al, Nature 363 (1993), 156—159). Z.B. können solche Peptidanaloga bewirken, daß die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle hochreguliert wird (z. B. IL2-Rezeptor, LFA-1), daß jedoch keine Proliferation oder Cytokin-Expression erfolgt. T-Zellen, die mit einem solchen Peptidanalogen in Wechselwirkung treten, gehen in einen sogenannten anergen Zustand über, d. h. sie können auch durch eine nachfolgende reguläre Stimulation mit einem immunogenen Peptid nicht mehr proliferieren. Dieser anerge Zustand hält mindestens 7 Tage an und läßt sich deshalb therapeutisch bei der Behandlung einer Autoimmunerkrankung nutzen.

Ein weiterer therapeutischer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß das Peptid bzw. der Komplex aus Peptid und MHC-Molekül als Antigen verwendet werden kann. Ein derartiges Antigen kann dabei als Immunogen, d. h. als ein die Immunantwort stimulierendes Mittel oder als Tolerogen wirken, d. h. als ein Mittel, das eine Immuntoleranz hervorruft. Die Verwendung als Immunogen kann z. B. bei der Vakzinierung gegen Tumorantigene Verwendung finden. Statt den bisher zu diesem Zweck verwendeten ganzen Tumorzellen ist es möglich, daß von den T-Zellen erkannte tumorspezifische Peptide im Komplex mit dem entsprechenden MHC-Molekül, insbesondere in Form eines oligomerisierten Komplexes, zu injizieren, um eine T-Zellantwort gegen den Tumor zu erzeugen. Zur Erhöhung der Immunstimulation kann dieser Komplex auch in Kombination mit zusätzlichen stimulierenden Substanzen verabreicht werden. Zu diesem Zweck sind beispielsweise Cytokine, wie etwa IL2 oder IL4 geeignet, die gegebenenfalls und vorzugsweise kovalent mit dem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex verknüpft sind. Eine weitere Möglichkeit ist die Assoziierung des Komplexes mit akzessorischen Komponenten für die T-Zellaktivierung, insbesondere mit für Antigen präsentierenden Zellen essenziellen Oberflächenmolekülen, z. B. dem Oberflächenmolekül B7.

Eine bevorzugte therapeutische Formulierung ist der Einbau von mit Peptid beladenen MHC-Molekülen in künstliche Vesikel, z. B. Lipidvesikel, die gegebenenfalls noch weitere membrangebundene Moleküle tragen können, wie z. B. B7 oder/und immobilisierte Cytokine.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Isolierung von T-Zellsubpopulationen, die mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder Peptid-MHC-Komplex reagieren. Bei einem solchen Verfahren bringt man eine T-Zellen enthaltende Probe, die z. B. aus einer Körperflüssigkeit stammt, die einem Patienten vorher entnommen wurde, mit einem erfindungsgemäßen Peptid oder einem erfindungsgemäßen Peptid-MHC-Komplex in Kontakt, identifiziert die mit dem Peptid oder Komplex reagierenden T-Zellen und trennt sie gegebenenfalls von anderen T-Zellen ab. Auch hier kann vor oder/und nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex vorzugsweise eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen, d. h. T-Zellen mit dem IL-2-Rezeptor, erfolgen.

Bei einem solchen Verfahren kann man das Peptid oder den Peptid-MHC-Komplex in immobilisierter Form auf einem Träger verwenden, wodurch die Abtrennung der positiv reagierenden T-Zell-Population von anderen

T-Zellen vereinfacht wird. Aus den auf diese Weise isolierten T-Zell-Subpopulationen können durch Restimulation T-Zelllinien angelegt werden. Diese autoreaktive T-Zelllinien können dann zur Immunisierung von Patienten verwendet werden.

Eine spezifische Immuntherapie des Typ I-Diabetes umfaßt zunächst die Isolierung von spezifischen T-Zelllinien gegen ein Autoantigen, z. B. GAD 65 aus IDDM-Patienten. Dann erfolgt eine Bestimmung der Feinspezifität der T-Zelllinien, d. h. die Identifizierung der autoreaktiven Peptide. Für die spätere Inokulation der Patienten werden solche T-Zelllinien ausgewählt, die ein prädominantes Peptid erkennen, d. h. ein Peptid, gegen das mehrere der isolierten T-Zelllinien reagieren. Insbesondere handelt es sich dabei um T-Zelllinien, welche ein Peptid mit den Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V) oder (VI) erkennen.

Falls sich bei einem Patienten kein eindeutig prädominantes Peptid findet, müssen für die spätere Inokulation mehrere T-Zelllinien gemischt werden. Die ausgewählten T-Zellklone werden vor der Inokulation nochmals mit Antigen-präsentierenden Zellen und den entsprechenden Peptiden stimuliert, um eine gute Expression von Aktivierungsmolekülen und insbesondere der T-Zellrezeptoren zu gewährleisten. Dann werden die T-Zelllinien inaktiviert, z. B. durch Hitzebehandlung oder/und radioaktive Bestrahlung, vorzugsweise mit einer Dosis im Bereich von 4000—10000 rad, besonders bevorzugt ca. 8000 rad, und subkutan in einer Zellenzahl von vorzugsweise  $10^7$  bis  $5 \times 10^7$  in den Patienten, aus dem sie gewonnen wurden, injiziert. Üblicherweise werden mindestens drei Injektionen über einen Zeitraum von 6 bis 12 Monaten verteilt.

Anschließend kann man die T-Zellantwort des Patienten auf das Inokulat testen. Hierzu isoliert man die peripheren Blutlymphozyten (PBLs) des Patienten, z. B. über Ficoll-Dichte-Gradientenzentrifugation, und testet die Proliferation gegen das Inokulat in einem Standard-Proliferationstest. Nach erfolgreich verlaufender Immunisierung sollte eine deutliche Proliferation der Patienten-PBLs gegen das Inokulat nachweisbar sein. Eine weitere Kontrolle des Immunisierungserfolgs kann durch Bestimmung der Frequenzen der GAD-reaktiven T-Zellen des Patienten im Verlauf der Immunisierung erfolgen. Dies kann z. B. nach dem Standardverfahren der Limiting Dilution mit autologen Stimulatorzellen erfolgen, die nach Inkubation mit GAD mit z. B. 4000 rad bestrahlt worden sein. Bei erfolgreich verlaufender Immunisierung nimmt die Frequenz der autoreaktiven T-Zellen deutlich ab.

Nach weiterer Eingrenzung der von den regulatorischen T-Zellen erkannten Oberflächenstrukturen auf den T-Zellen des Inokulates kann auch mit Teilstrukturen der regulatorischen T-Zellen immunisiert werden, z. B. mit Segmenten des T-Zellrezeptors.

Andererseits können bei einer Antitumorvakzinierung auch teilungsfähige T-Zellen reinjiziert werden, die zu einer aktiven Immunisierung des Patienten gegen Tumorzellen führen können.

Bei den diagnostischen und therapeutischen Verfahren zur Identifizierung bzw. Aktivierung/Inhibierung von spezifischen T-Zellsubpopulationen kann anstelle der erfindungsgemäßen Peptide oder Peptid-MHC-Moleküle auch ein anti-idiotypischer Antikörper verwendet werden, der die Wirkung des MHC-Peptid-Komplexes nachahmt. Derartige Antikörper können ohne weiteres erhalten werden, indem eine gegen ein bestimmtes Peptid spezifische T-Zellsubpopulation als Immunogen zur Erzeugung eines Antikörpers (z. B. in einer Maus) verwendet wird oder indem zuerst ein erster Antikörper gegen den MHC-Peptid-Komplex und dann ein antiidiotypischer Antikörper gegen den ersten Antikörper erzeugt wird.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch ein Antikörper (erster Antikörper) gegen ein erfindungsgemäßes Peptid oder Peptid-Derivat oder einen erfindungsgemäßen Komplex, erhältlich durch Immunisierung, mit dem Peptid, Peptid-Derivat oder Komplex und Gewinnung eines durch Immunisierung erzeugten Antikörpers, vorzugsweise eines durch das Verfahren von Köhler und Milstein oder Weiterentwicklungen davon hergestellten monoklonalen Antikörpers.

Schließlich betrifft die Erfindung auch einen anti-idiotypischen Antikörper gegen den ersten Antikörper, erhältlich durch Immunisierung mit dem ersten Antikörper, der gegen das Peptid oder Peptid-Derivat oder den Komplex gerichtet ist, und Gewinnung eines durch die Immunisierung erzeugten anti-idiotypischen Antikörpers.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine T-Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen autoreaktiven Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum oder einem Komplex aus Peptid und MHC-Molekül reagiert. Bevorzugte Beispiele sind T-Zellen, die von den T-Zelllinien R.B. oder M.C. stammen oder eine äquivalente T-Zellrezeptor-Bindungsspezifität aufweisen, d. h. ein von einem MHC-Molekül präsentiertes Peptid oder Peptid-Derivat der Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V) oder/und (VI) oder/und Teilbereichen dieser Aminosäuresequenzen erkennen.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch die Verwendung von Peptiden aus GAD, insbesondere humaner GAD 65, davon abgeleiteten Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika zur Herstellung eines Arzneimittels, das bei Verabreichung an Diabetes-Patienten zur Ausbildung einer Immuntoleranz führt. Vorzugsweise werden hierfür Peptide der Aminosäuresequenzen (I), (II), (III), (IV), (V), (VI) bzw. mit den in EP 95 100 764.0 vorgeschlagenen Aminosäuresequenzen, Teilbereiche dieser Peptide mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und Aminosäuren mit einer im wesentlichen äquivalenten Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die obengenannten Peptidsequenzen verwendet. Vorzugsweise haben die Peptide eine Länge von mindestens 8 Aminosäuren, besonders bevorzugt eine Länge von 10 bis 25 Aminosäuren.

Grundlage dieser Erfindung sind Beobachtungen, die bei einer in vitro-Verwendung von Peptiden zur T-Zellstimulation gemacht wurden. Wenn man nämlich bereits etablierte T-Zelllinien mit einem als reaktiv identifizierten Peptid, z. B. einem Peptid mit einer Länge von 20 Aminosäuren, stimuliert, dann erfolgt eine Proliferation, die annähernd so hoch ist wie bei Verwendung des nativen Antigens, z. B. rekombinante humane GAD 65 kd. Wenn man die solchermaßen expandierten T-Zellen in einer zweiten Runde nach ca. 10 Tagen nochmals restimuliert, erhält man eine viel schwächere proliferative Antwort als wenn in der ersten Runde das native Antigen verwendet wurde. Dieser Befund ist unabhängig davon, ob man bei der zweiten Runde wieder das Peptid oder das native Antigen verwendet. Eine dritte Restimulation endet meistens in einem vollständigen Absterben der



T-Zellen, auch wenn als Antigen native GAD 65 kd verwendet wird.

Für diese Anwendungsform werden die Peptide in relativ hohen Dosierungen, vorzugsweise von 1 bis 100 mg, besonders bevorzugt von 3 bis 30 mg und am meisten bevorzugt von 5 bis 10 mg pro kg Körpergewicht verabreicht.

Weiterhin ist bevorzugt, daß nach der erstmaligen Verabreichung der Peptide, d. h. der Erstvakzinierung, mindestens noch eine zweite Vakzinierung und besonders bevorzugt noch mindestens eine dritte Vakzinierung durchgeführt wird. Bei der zweiten und den gegebenenfalls folgenden Vakzinierungen werden vorzugsweise die bereits zur Erstvakzinierung verwendeten Peptide, komplette GAD oder/und ein die Sequenz der Peptide enthaltender Teil davon eingesetzt. Bei einer Mehrfachvakzinierung sind die Intervalle zwischen den einzelnen Vakzinierungen vorzugsweise jeweils von 5 bis 25 Tagen, besonders bevorzugt von 7 bis 14 Tagen.

Weiter soll die Erfindung durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den Abb. 1, 2, 3A, 3B und 3C erläutert werden.

Abb. 1 zeigt autoreaktive Aminosäuresequenzen gemäß EP 95 100 764.0,

Abb. 2 zeigt weitere autoreaktive Aminosäuresequenzen gemäß EP 95 100 764.0,

Abb. 3A zeigt das Ergebnis eines Peptid-Screeningassays der T-Zelllinien R.B. und M.C. mit rekombinanter humaner GAD bzw. Peptidpools,

Abb. 3B zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays mit der T-Zelllinie R.B. mit Einzelpeptiden aus rGAD und

Abb. 3C zeigt das Ergebnis eines Proliferationsassays mit der T-Zelllinie M.C. mit Einzelpeptiden aus rGAD.

## BEISPIEL 1

### Etablierung von GAD-spezifischen T-Zelllinien

#### 1. Primärstimulation

Durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation werden aus EDTA-Blut von Typ I-Diabetikern die peripheren Blut-Lymphozyten (PBLs) gewonnen. Die Zellen werden 2 mal in RPMI-Medium gewaschen und dann in einem Kulturmedium, bestehend aus RPMI 1640, 5% Humanserum, 2 mM Glutamin und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, aufgenommen. Pro Napf einer 96 Napf Rundboden-Platte werden 100 µl Zellsuspension, entsprechend 100000 Zellen, eingesät. Danach erfolgt die Zugabe von rekombinanter humaner GAD 65 kd (rGAD), die im Baculovirus-System exprimiert wurde, in einer Endkonzentration von 3 bis 5 µg/ml. Die Zellen werden 3—4 Tage im Blutschrank bei 37°C/7% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach diesem Zeitraum erfolgt Zugabe von 100 µl IL-2 (5 U/ml). Nach weiteren 3—4 Tagen werden von allen Kulturansätzen 100 µl abgesaugt und wiederum 100 µl IL-2 (5 U/ml) zugegeben. Dies wird alle 3—4 Tage wiederholt.

#### 2. Restimulation

Am Tag 14 nach dem Beginn der Primärstimulation erfolgt die erste Restimulation. Hierfür wird im Vergleich zur Primärstimulation die doppelte Anzahl von autologen PBLs mittels Ficoll isoliert und in Kulturmedium auf eine Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$ /ml eingestellt. Eine Hälfte dieser Stimulatorzellen wird mit dem Antigen rGAD (Endkonzentration 3 bis 5 µg/ml) für 2 Stunden/37°C/7% CO<sub>2</sub> inkubiert (Antigen-Pulse). Die andere Hälfte wird unter gleichen Bedingungen ohne Antigen, nur mit Kulturmedium inkubiert. Anschließend werden alle Stimulatorzellen mit 4000 rad bestrahlt. Die Stimulatorzellen werden dann in 96 Napf Rundboden-Platten verteilt (je 100000 Zellen/Napf) und zwar so, daß immer ein Napf mit Antigen enthaltenden Stimulatorzellen benachbart zu einem Loch mit Stimulatorzellen ohne Antigen zu liegen kommt.

Anschließend erfolgt die Präparation der T-Zellen aus den Primärstimulationsansätzen. Hierfür werden die Überstände aus den Primärstimulationsansätzen abgesaugt und die Zellen in den Platten zweimal mit je 100 µl Waschmedium (Dulbeccos Modified Eagle Medium = DMEM) gewaschen. Dazwischen werden die Zellen in den Platten bei 400 g zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in je 100 µl Kulturmedium aufgenommen und je 50 µl auf zwei benachbarte Näpfe der Restimulations-Platte verteilt. Auf diese Weise werden die T-Zellen in einem Napf mit Antigen inkubiert und im benachbarten Napf ohne Antigen kann die Antigen-Spezifität der Restimulation kontrolliert werden.

Ab dem 2. oder 3. Tag nach dem Beginn der Restimulation kann die Proliferation mikroskopisch beurteilt werden. Dabei werden nur solche Mikrokultur-Pärchen als relevant angesehen, bei denen nur im Napf mit Antigen-Anwesenheit Proliferation erfolgt. Ab Tag 4 wird wiederum zu jedem Kultur-Napf 100 µl IL-2 (5 U/ml) zugegeben. Bis zum Tag 14 wird alle 3—4 Tage ca. 50% des Kulturmediums gegen IL-2 (5 U/ml) ausgetauscht.

Bei gutem Wachstum werden die Kulturen auf mehrere 96er Näpfe aufgeteilt. Bei späteren Restimulationen kann auch in größere Näpfe aufgeteilt werden. Alle 2 Wochen erfolgt eine erneute Restimulation nach der oben beschriebenen Methode. Ab der 3. Restimulation wird die Spezifität der Mikrokulturen in einem Proliferationstest ermittelt.

#### 3. Proliferationstest mit rekombinanter humaner GAD 65 kd

Alle Tests werden mindestens in Doppel-Ansätzen durchgeführt.

a) Stimulator-Zellen:

Als Stimulatorzellen (APC) werden autologe PBLs oder in den HLA-Klasse II Antigenen identische PBLs

eines normalen Spenders verwendet. Die PBLs werden in einer Zahl von 100000 pro Loch einer 96 Napf-Platte verteilt und mit rGAD in einer Endkonzentration von 3 bis 5 µg/ml versetzt. In Kontrollansätzen wird statt Antigen ein gleiches Volumen an Medium vorgegeben. Nach Inkubation von 2 h bei 37°C und 7% CO<sub>2</sub> werden die Stimulatorzellen mit 4000 rad bestrahlt.

5 b) T-Zellen:

Die verwendeten T-Zellen stammen immer aus der Abschlußphase einer Restimulationsperiode. Sie werden 3 mal mit DMEM von Antigen und IL-2-freigewaschen und mit 6000 bis 10000 Zellen/96er Napf verteilt.

10 Nach 3—4 Tagen bei 37°C/7% CO<sub>2</sub> erfolgt die Zugabe von 1 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin und weitere Inkubation für 16—20 Stunden. Danach erfolgt das Übertragen der Zellen auf einen Glasfaserfilter mittels eines Zell-Ernte Gerätes und die Bestimmung der eingebauten Radioaktivität im β-Zählgerät. Die Proliferationsaktivität der T-Zelllinien wird mittels eines Stimulationsindex (SI) ausgedrückt. Dies ist der Quotient aus den cpm in Anwesenheit von rGAD dividiert durch die cpm in den Kontrollansätzen ohne Antigen. Abb. 3A (Säule rGAD) zeigt ein typisches Ergebnis eines Proliferationstests mit rGAD und den Linien R.B. und M.C.

15 4. Proliferationstest mit Peptiden, die aus der H-GAD 65 kd Sequenz abgeleitet sind

T-Zelllinien, die über mindestens 4 Restimulationsrunden expandiert wurden und mit rGAD im Proliferationstest reagierten, wurden zusätzlich mit überlappenden Peptiden der rGAD getestet. Diese Experimente haben 20 zum Ziel, die von den T-Zellen erkannten Epitope der rGAD zu definieren. Dazu werden zunächst sich überlappende 20 mer Peptide der rGAD synthetisiert (Überlappungsbereich 10 Aminosäuren, insgesamt 59 verschiedene Peptide).

Jeweils 4—5 dieser Peptide werden zu einem Pool vereinigt und in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zu den Stimulatorzellen gegeben (Präparation der Stimulatorzellen wie unter Abschnitt 3a beschrieben).

25 Danach erfolgt die Zugabe von 6000-20.000 T-Zellen pro Mikrokultur-Napf. Das weitere Verfahren ist analog dem unter Abschnitt 3b beschrieben.

Abb. 3A zeigt die Ergebnisse dieses Peptid-Screeningassays. Die T-Zelllinie R.B. reagiert mit dem Peptidpool, der die rGAD-Sequenzabschnitte 46—115 enthält, während die T-Zelllinie M.C. Peptide aus dem Sequenzabschnitt 216—285 erkennt. In Abb. 3B bzw. 3C sind die Reaktivitäten der T-Zelllinie R.B bzw. M.C. mit den 30 Einzelpeptiden des jeweiligen Peptidpools dargestellt. Die Linie R.B. reagiert ausschließlich mit dem Peptid p86—105, während die Linie M.C. für das Peptid p246—265 spezifisch ist. Bei diesen Proliferationstests wurden die Peptide in einer Konzentration von 3 µg/ml eingesetzt.

Beispiel 2

35 Bestimmung des Subtyps von MHC-Molekülen, die den T-Zelllinien R.B. und M.C. autoreaktive Peptide präsentieren

Die Versuchsdurchführung erfolgte analog dem Beispiel 1.4. Als Antigen-präsentierende Zellen wurden 40 allerdings keine autologen PBLs verwendet, sondern Epstein Barr Virus transformierte B-Zellen mit definierten MHC-Allelen (sogenannte homozygote Typisierungszelllinien). Diese wurden so ausgewählt, daß nur eine teilweise Übereinstimmung mit den MHC-Klasse II Molekülen des Spenders der T-Zelllinien gegeben war, z. B. Identität in den DR-Allelen, Nichtidentität bezüglich der DQ-Allele. In Abweichung vom beschriebenen Beispiel 1.4 wurden die Peptide nach dem Antigenpulsus ausgewaschen, um eine Autopräsentation durch die T-Zellen zu 45 vermeiden.

Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 1 dargestellt. Die T-Zellproliferation ist als Stimulationsindex (SI) ausgedrückt.

Das Ergebnis dieser Analyse ist bei der T-Zelllinie R.B. eindeutig. Nur wenn die Antigen-präsentierenden Zellen das Peptid p86—106 in Assoziation mit DRB1\*0101 präsentieren, erfolgt eine Stimulation der T-Zellen. 50 Andere DR-Allele können das Peptid nicht präsentieren, eine Beteiligung des DQ-Alleles DQB1\*0501 konnte ausgeschlossen werden (siehe Ergebnis mit den antigenpräsentierenden Zellen MZ070782). Somit ist DRB1\*0101 das Restriktionselement für die T-Zelllinie R.B. Für die T-Zelllinie M.C. konnte das Restriktionselement durch diese Art der Analyse nicht im Detail aufgeklärt werden, da das DR-Allel DRB1\*1501 und das DQ-Allel DQB1\*0602 in der kaukasischen Bevölkerung eng gekoppelt vorliegen. Die Analyse ergab eine 55 Präsentation des Peptids entweder über die DR-Allele DRB1\*1501 bzw. 1601 oder über das DQB1 0602 Allel.

Tabelle 1

APC	DRB1* :DQB1*	kein Antigen (CPM)	T-Zelllinienproliferation rGAD (SI)	Peptid 86-105 (SI)	246-265 (SI)
	R.B. T-Zelllinie				
PBMC	0101/0401 : 0501/0302	898	56	28	
JESTHOM	0101 : 0501	840	-	20	
HOM2	0101 : 0501	215	-	118	
YAR	0402 : 0302	2859	-	-	
MZ070782	0102 : 0501	3000	-	-	
PE117	0404 : 0302	6238	-	-	
DEU	0401 : 0301	2182	-	-	
	M.C. T-Zelllinie				
PBMC	1501/1302 : 0602/0604	864	32	28	
HHKB	1301 : 0603	749	-	-	
KAS011	1601 : 0502	961	-	-	
OMW	1301 : 0603	792	-	-	
E4181324	1502 : 0601	896	-	34	
WT47	1302 : 0604	526	-	-	
WT8	1501 : 0602	1079	11	41	
HO31	1302 : 0604	1300	-	-	
EA	1501 : 0602	3298	13	12	

## Patentansprüche

1. Peptid oder Peptid-Derivat, umfassend:
  - (a) die Aminosäuresequenz (I)  
D-V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A-C-D-G-E-R,
  - (b) die Aminosäuresequenz (II)  
S-N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P-E-V-K-E-K,
  - (c) die Aminosäuresequenz (III)  
N-W-E-L-A-D-Q-P-Q-N-L-E-E-I-L-M-H-C-Q-T,
  - (d) die Aminosäuresequenz (IV)  
T-L-K-Y-A-I-K-T-G-H-P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G,
  - (e) die Aminosäuresequenz (V)  
P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G-L-A-A-D-W,
  - (f) die Aminosäuresequenz (VI)  
T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R,
  - (g) Teilbereiche der in (a), (b), (c), (d), (e) oder/und (f) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und
  - (h) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die in (a), (b), (c), (d), (e), (f) oder/und (g) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.
2. Peptid oder Peptid-Derivat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Länge von mindestens 8 Aminosäuren aufweist.
3. Peptid oder Peptid-Derivat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Länge von mindestens 10 Aminosäuren aufweist.
4. Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Länge von bis zu 25 Aminosäuren aufweist.
5. Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Markierungsgruppe trägt.
6. Peptidmimetikum, dadurch gekennzeichnet, daß es eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5 aufweist.
7. Komplex, der mindestens ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder ein Peptidmimetikum nach Anspruch 6 umfaßt, das an ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls gebunden ist.
8. Komplex nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß er ein MHC-Klasse II-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon umfaßt.
9. Komplex nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das MHC-Klasse II-Molekül den Typ DR1, DR2 oder DQ6 aufweist.
10. Komplex nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das MHC-Klasse II-Molekül den Subtyp DR B1 0101, DR B1 1501, DR B1 1502, DR B1 1601 oder DQ B1 0602 aufweist.
11. Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß er ein rekombinantes MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon umfaßt.
12. Komplex nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß er ein lösliches peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls umfaßt.
13. Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß er eine Markierungsgruppe trägt.
14. Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens 2 MHC-Moleküle oder MHC-Molekül-derivate enthält, die über kovalente oder nichtkovalente Wechselwirkungen assoziiert sind.
15. Komplex nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er durch chemische Kopplungsreagenzien quervernetzte Peptid-MHC-Molekül-Komplexe enthält.
16. Komplex nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er durch eine oligomerisierte Peptidkomponente mit mehreren MHC-bindenden Bereichen vernetzte MHC-Moleküle oder MHC-Molekül-derivate enthält.
17. Komplex nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er durch Antikörper vernetzte Peptid-MHC-Molekül-Komplexe enthält.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, ein Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder/und einen Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17 als aktive Komponente gegebenenfalls in Kombination mit pharmazeutisch üblichen Zusatzstoffen enthält.
19. Zusammensetzung nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin eine akzessorische stimulierende Komponente umfaßt.
20. Zusammensetzung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die akzessorische stimulierende Komponente ausgewählt ist aus Cytokinen oder/und dem Oberflächenantigen B7.
21. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 20 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Erkrankungen oder einer Prädisposition für Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen, oder von Tumorerkrankungen oder einer Prädisposition für Tumorerkrankungen.

22. Verwendung nach Anspruch 21 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition für Autoimmunerkrankungen.
23. Verwendung nach Anspruch 21 oder 22 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Diabetes oder einer Prädisposition für Diabetes.
24. Verfahren zur Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation, dadurch gekennzeichnet, daß man eine T-Zellen enthaltende Probe mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder/und einem Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17 in Kontakt bringt und die Reaktion von T-Zellen in der Probe mit dem Peptid oder Komplex bestimmt.
25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktion der T-Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten Peptid oder Komplex durch FACS-Analyse bestimmt.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß man vor und/oder nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen durchführt.
27. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 18 bis 20 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen.
28. Verwendung nach Anspruch 27 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Autoimmunerkrankungen.
29. Verwendung nach Anspruch 27 oder 28 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Diabetes.
30. Verwendung eines Peptids oder Peptid-Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 5, eines Peptidmimetikums nach Anspruch 6 oder eines Komplexes nach einem der Ansprüche 7 bis 17 zur Herstellung eines Antigens, insbesondere eines Immunogens oder Tolerogens.
31. Verfahren zur Isolierung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation, dadurch gekennzeichnet, daß man eine T-Zellen enthaltende Probe mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder einem Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17 in Kontakt bringt, die mit dem Peptid oder Komplex reagierenden T-Zellen identifiziert und gegebenenfalls von anderen T-Zellen abtrennt.
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß man vor oder/und nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Peptid oder dem Komplex eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen durchführt.
33. Verwendung von nach dem Verfahren gemäß Anspruch 31 isolierten T-Zellen oder Teilstrukturen davon zur Herstellung eines Antigens.
34. Verwendung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die T-Zellen oder Teilstrukturen davon in den Patienten, aus dem sie ursprünglich stammen, reinjiziert werden.
35. Verwendung nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß inaktivierte T-Zellen reinjiziert werden.
36. Verwendung nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß teilungsfähige T-Zellen reinjiziert werden.
37. Antikörper gegen ein Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, ein Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder einen Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17, erhältlich durch Immunisierung mit dem Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder Komplex und Gewinnung eines durch die Immunisierung erzeugten Antikörpers.
38. Anti-idiotypischer Antikörper gegen einen Antikörper nach Anspruch 37, erhältlich durch Immunisierung mit dem Antikörper gegen das Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum oder den Komplex und Gewinnung eines durch die Immunisierung erzeugten anti-idiotypischen Antikörpers.
39. T-Zelle, die mit einem Peptid oder Peptid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, einem Peptidmimetikum nach Anspruch 6 oder einem Komplex nach einem der Ansprüche 7 bis 17 reagiert.
40. Verwendung von Peptiden aus Glutamin-Decarboxylase (GAD), davon abgeleiteten Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika zur Herstellung eines Arzneimittels, das bei Verabreichung an Diabetes-Patienten zur Ausbildung einer Immuntoleranz führt.
41. Verwendung nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß man die Peptide, Peptid-Derivate oder Peptidmimetika in einer Dosis von 3 bis 30 mg pro kg Körpergewicht verabreicht.
42. Verwendung nach Anspruch 40 oder 41, dadurch gekennzeichnet, daß nach Verabreichung der Peptide, Peptid-Derivate oder Peptidmimetika mindestens noch eine zweite Vakzinierung durchgeführt wird.
43. Verwendung nach einem der Ansprüche 40 bis 42, dadurch gekennzeichnet, daß man bei der zweiten und gegebenenfalls folgenden Vakzinierungen die bereits zur Erstvakzinierung verwendeten Peptide, Peptid-Derivate oder Peptidmimetika komplette GAD oder/und einen die Sequenz der Peptide enthaltenden Teil davon einsetzt.
44. Verwendung nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Vakzinierungen jeweils in Intervallen von 7 bis 14 Tagen erfolgen.
45. Verwendung nach einem der Ansprüche 40 bis 44, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Mischung von unterschiedlichen Peptiden, Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika verabreicht.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

# Abb. 1

I-L-I-K-C-D-E-R-G-K-M-I-P-S

L-G-I-G-T-D-S-V-I-L-I-K-C-D

L-A-F-L-Q-D-V-M-N-I-L-L-Q-Y

Y-D-L-S-Y-D-T-G-D-K-A-L-Q-C

## Abb. 2

V-S-Y-Q-P-L-G-D-K-V-N-F-F-R  
L-A-A-D-W-L-T-S-T-A-N-T-N-M  
L-L-Y-G-D-A-E-K-P-A-E-S-G-G  
V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A  
L-L-Q-Y-V-V-K-S-F-D-R-S-T-K  
F-T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y  
L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R-E-I-I-G  
N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P  
K-I-W-M-H-V-D-A-A-W-G-G-G-L  
W-G-G-G-L-L-M-S-R-K-H-K-W-K  
E-G-Y-E-M-V-F-D-G-K-P-Q-H-T  
R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G  
W-L-T-S-T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E  
T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E-I-A-P-V  
L-V-S-A-T-A-G-T-T-V-Y-G-A-F  
Y-I-P-P-S-L-R-T-L-E-D-N-E-E  
V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F

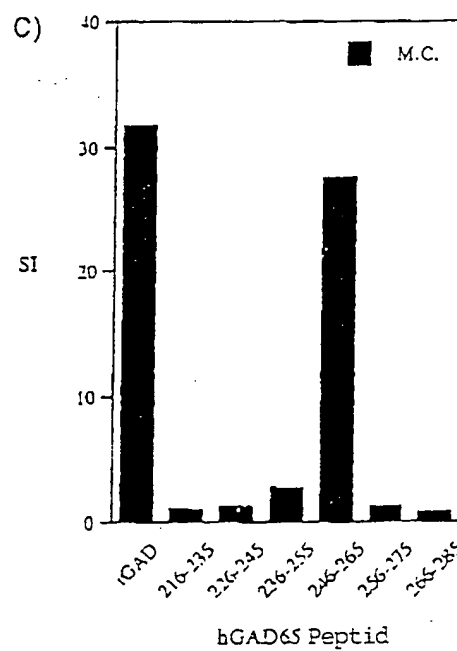
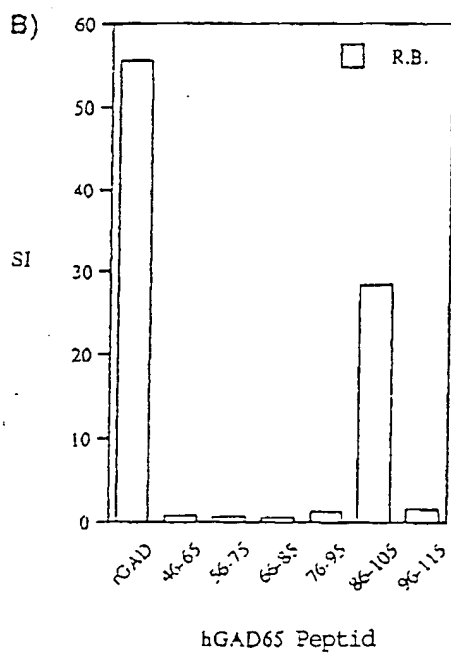
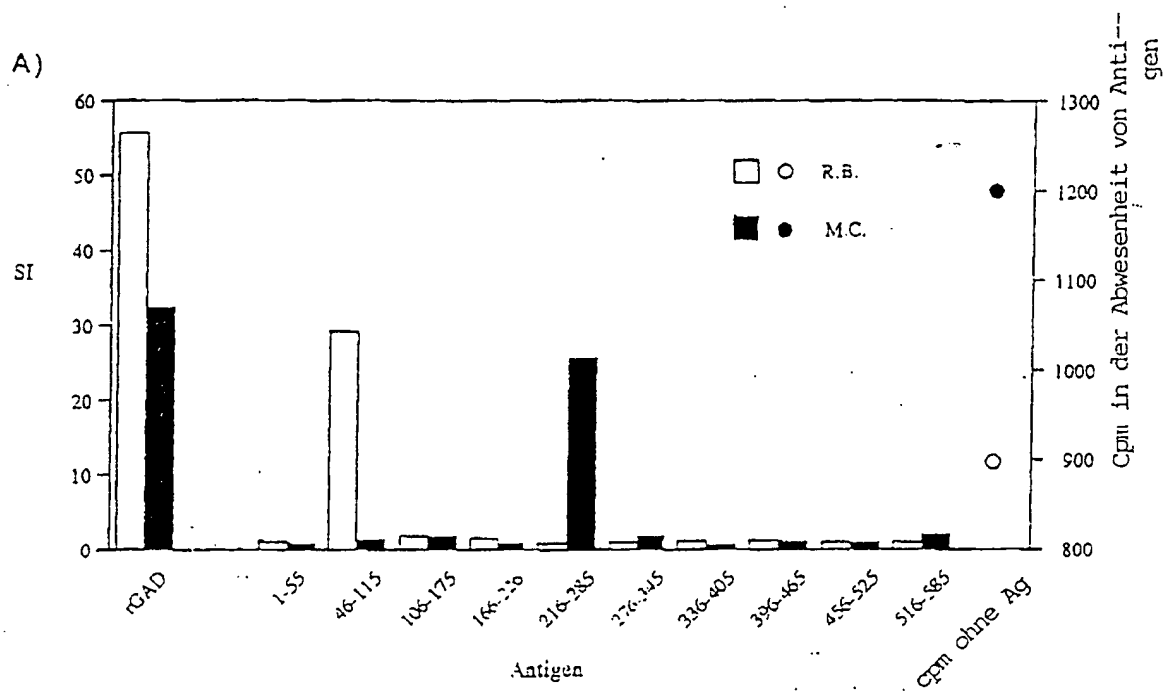


Abb. 3